

自动化工作站联合Echo® MS加速合成生物学克隆筛选

Accelerate clone screening in synthetic biology by combine automated workstation and Echo® MS

高铁¹, 方晶晶¹, 刘达淮², 庞志敏², 张志丹³, 郭立海¹

Gao Tie¹, Fang Jingjing¹, Liu Dawei², Pang Zhimin², Zhang Zhidan³, Chen Hongxu¹, Guo Lihai¹

¹ SCIEX应用技术中心, 中国

² 贝克曼库尔特生命科学

³ 中国科学院天津工业生物技术研究所低碳制造工程生物学重点实验室

关键词: 合成生物学, 自动化工作站, Echo® MS, 高通量筛选

前言

合成生物学是现代科学极富前景的学科之一, 是将生物科技领域基础研究转化为实际社会生产力的关键科学技术, 也是改变未来世界的主要技术之一。其借鉴了工程学的概念, 运用基因技术, 构建生物功能元件、装置和系统, 有目标的重新设计和合成新的生物体系或改造已有的生物体系, 使其拥有满足人类需求的生物功能。

合成生物学所涉及的流程包含基因组、分子克隆、细胞培养和蛋白表达, 其中分子克隆的目的是将目的基因插入底盘细胞中并进行表达, 在这个过程中需要进行底盘细胞菌株的筛选, 而特定代谢性状的菌株筛选是限速的关键步骤。快速、准确、同时定量多种代谢物对多角度菌株性能评估和菌株筛选至关重要, 通用的方法或平台可大幅减少方法开发时间, 加快筛选过程。目前已有报道多种用于筛选的方法, 包括生化测定、荧光技术和色谱分析等方法, 但这些方法在灵敏度、特异性、重现性、普适性、可拓展性和使用成本上都面临挑战。如生化分析需要特定的酶, 荧光技术也需要量身定制的荧光标志物, 导致这些方法的通用性较差、复杂程度较高; 而色谱分析方法的通用性较强, 但涉及复杂的样品前处理和分析过程中需要冗长的时间, 这使得该类方法在高通量筛选应用中并不理想。

在高通量菌株快速筛选的工作中, 中国科学院天津工业生物技术研究所(天工所)开发了一个创新平台——超高通量前处理及分析平台(UTPA, Ultrahigh throughput pretreatment and

analysis)。该平台技术结合了自动化装备及声波激发耦合质谱系统(ADE-OPI-MS, Acoustic Droplet Ejection-Open Port Interface-Mass Spectrum)两个模块, 将样品前处理及样品检测的速度大幅提升, 如图1所示。模块A使用Beckman自动化工作站, 包含了耗材堆栈、液体处理工作站、正压过滤模块, 低温高速离心机, 通过机械臂实现内部串联; 模块B使用SCIEX Echo® MS, 包含了声波激发系统、OPI系统和OptiFlow电喷雾离子源的三重四级杆质谱系统, 如图2所示。模块A自动连续整合了培养基分离、样品稀释、转移、离心和涡旋五个步骤, 在处理384孔样品板时, 需要的时间小于20 min; 模块B单个样品的进样分析仅需1 s, 对于384孔样品分析最快仅需6.4 min。相比传统LC-MS的方法, 整个流程的速度提升了72倍。

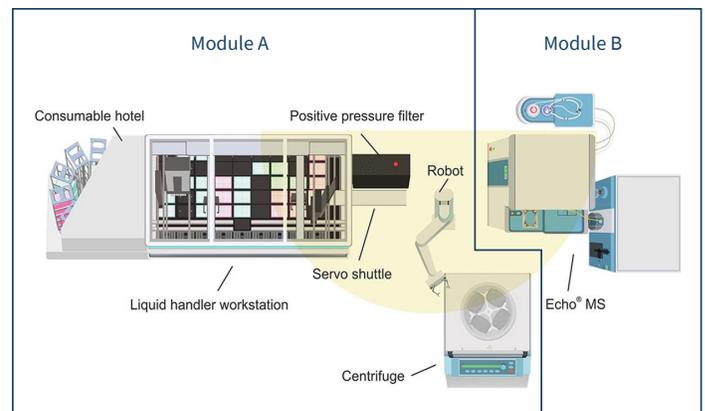


图1. 超高通量前处理及分析平台(UTPA)

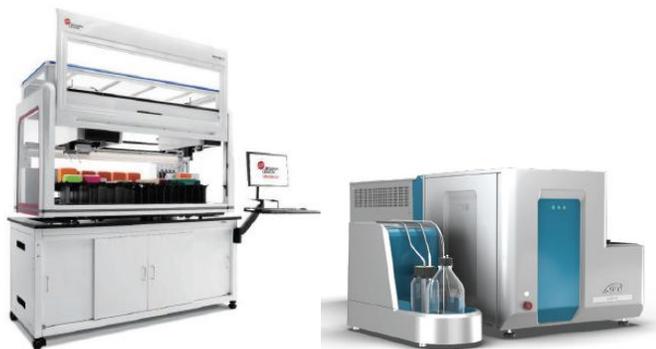


图2. Beckman自动化工作站i7与SCIEX Echo® MS系统

Beckman自动化工作站的优势:

1. 开放式平台设计，轻松实现设备左、右、后、下的“4D整合”，例如分析设备、外部存储/培养箱和实验室耗材供给站。Biomek i-Series工作站可根据用户不断扩展的需求，轻松集成各种设备、组件和配件。
2. 采用封闭式设计的 Biomek i Series自动化工作站搭配层流罩，高效保护试剂免遭空气颗粒污染*
3. DeckOptix摄像头，支持实时直播运行过程，并自动捕捉出错时间的视频信息，协助异常情况的快速诊断
4. 高精度和平行性的多通道加样器以及8通道加样器，可用于0.5 µl-5ml的移液

SCIEX Echo® MS系统的优势:

1. **更高的分析速度:** 1秒/样品的速度，实现目标代谢物的高通量分析。
2. **样品消耗量更低:** 样本最小进样体积仅2.5 nL，减少样本的需求和浪费。
3. **无残留与干扰:** 非接触式的进样方式确保无残留与干扰。
4. **定量更精准:** 减少样品的复测率（参考文章中数据）。

本文通过在六种发酵培养基中筛选谷氨酸棒状杆菌的谷氨酸高产菌株，展示了我们的UTPA平台的能力。通过追踪谷氨酸为目标产物、谷氨酰胺为潜在干扰副产物、乳酸为主要副产物、葡萄糖为发酵底物的4种代表性代谢物，从多个层面评价菌株的性能。

材料与amp;方法

样品及试剂

谷氨酸(GLU)、谷氨酰胺(GLN)、乳酸(LAC)、葡萄糖(GLUC)、HPLC级甲酸(FA)和HPLC级氯化铵(NH₄F)购自Sigma-Aldrich。内标(IS) D5-GLU、D5-GLN、D3-LAC和13C6-GLUC购自剑桥同位素实验室公司(中国青岛)。HPLC级甲醇(MeOH)和乙腈(ACN)购自Fisher。去离子水(H₂O)由Millipore Plus系统制备。其余试剂均为分析纯。

样品前处理

从谷氨酰胺C. ATCC 13869分离得到348株试验菌株进行筛选。以12株携带主干质粒的野生菌株为对照。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)、M9、CGXII、Luria-Bertani培养基(LB)、胰蛋白酶豆汤培养基(TSB)和谷氨酸发酵培养基(GFM)。将试验菌株348株和对照菌株12株分别接种到种子培养基上，在30°C、220 rpm下振荡培养8 h。然后将10 µL的种子移栽到4个96孔板上，每孔200 µL GFM，每孔200 µL培养20 h(试验菌株93株，对照菌株3株，试验菌株69株，对照菌株3株，对照菌株69株，对照菌株4株)。

96孔板通过自动化系统进行处理，通过机械臂把含有细菌培养物的96孔板抓取至离心机中在4°C下4000 r/min离心10 min。使用96通道吸头抽吸上清液并转移到新的96孔板上。然后使用96通道的自动化移液器向新96孔板加入95 µL的超纯水，使用工作站台面震荡混匀模块对混合物进行旋涡处理，进行ADE-OPI-MS分析。

使用自动化移液工作站将稀释后的样品和加入标准溶液的标准样品各20 µL转移到384孔板上。通过机械臂转移384孔板至离心机在1500 r/min下离心5 min，机械臂抓取回震荡孵育模块在4°C下涡旋2 min。之后，将板转移到Echo®MS中进行ADE-OPI-MS分析。

Echo® MS方法:

载液为2 mM NH₄F、50% MeOH/50% ACN (V/V)，流速为550 µL/min。进样量2.5 nL，延迟时间设置为0.5 s。6500+质谱仪在负离子多反应监测(MRM)模式下运行，源温度为300°C，喷雾电压为-4500V，Gas1为90 psi，Gas2为70 psi，Curtain Gas为25 psi，CAD Gas为9 psi。表1为每种代谢物的DP与CE。

结果与amp;讨论

方法学验证

依据FDA的Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry指导原则进行了多方面的方法学验证，验证的样品为谷氨酸(GLU)、谷氨酰胺(GLN)、乳酸(LAC)、葡萄糖(GLUC)，基质为水、PBS、M9、CGXII、LB、TSB和GFM。

表1. 不同代谢物的离子对信息及DP、CE设置

Compounds	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Dwell time (ms)	Declustering Potential (V)	Collision energy(V)
GLU	146	102	20	-20	-20
D ₅ -GLU	151	107	20	-20	-20
GLN	145	127	20	-30	-16
D ₅ -GLN	150	132	20	-30	-16
LAC	89	43	20	-140	-15
D ₃ -LAC	92	45	20	-140	-15
GLUC	179	59	20	-50	-20
¹³ C ₆ -GLUC	185	61	20	-50	-20

在线性及灵敏度的考察中，7种基质中4种代谢物的灵敏度，分别以各自的定量下限(LLOQ)测定，每种代谢物6个重复，线性范围为0.005 ~ 50 mM。通过绘制峰面积与化合物标准溶液浓度的关

系来构建校准曲线。采用最小二乘回归模型，线性回归方程表示为 $y = ax + b$ ，相关系数 R^2 应大于0.99。结果如表2所示。

表2. 4种代谢物在7种不同基质中的线性及灵敏度考察

Matrix	Compounds	Regression equation	r ²	Linear range (mM)	LLOQs (fold)
H ₂ O	GLU	$y=0.8774x+0.0009$	0.9953	0.01–30	0.01
	GLN	$y=1.3512x+0.0048$	0.9964	0.025–10	0.025
	LAC	$y=0.4705x+0.0345$	0.9957	0.25–50	0.25
	GLUC	$y=0.7419x+0.0163$	0.9993	0.05–50	0.05
PBS	GLU	$y=0.8527x+0.0072$	0.9938	0.05–8.75	0.05 (5)
	GLN	$y=1.3574x+0.0118$	0.9936	0.025–20	0.025 (1)
	LAC	$y=0.4776x+0.0004$	0.9958	1.75–50	1.75 (7)
	GLUC	$y=0.5184x+0.0062$	0.9904	0.075–50	0.075(1.5)
M9	GLU	$y=0.8558x+0.0080$	0.9977	0.025–40	0.025 (2.5)
	GLN	$y=1.2934x+0.0117$	0.9960	0.025–20	0.025 (1)
	LAC	$y=0.4562x+0.0316$	0.9958	0.75–50	0.75 (3)
	GLUC	$y=0.6062x+0.0350$	0.9968	0.1–50	0.1 (2)
CGX II	GLU	$y=0.8226x+0.0181$	0.9958	0.05–50	0.05 (5)
	GLN	$y=1.2931x+0.0065$	0.9975	0.1–50	0.1 (4)
	LAC	$y=0.4673x+0.3038$	0.9990	0.75–50	0.75 (3)
	GLUC	$y=0.6591x+0.0216$	0.9915	0.25–50	0.25 (5)
LB	GLU	$y=0.8413x+0.9380$	0.9902	2.5–50	2.5 (250)
	GLN	$y=1.3040x+0.0051$	0.9954	0.075–40	0.075 (3)
	LAC	$y=0.4380x+0.0361$	0.9937	0.25–50	0.25 (1)
	GLUC	$y=0.3919x+0.5810$	0.9928	2.5–50	2.5 (50)
TSB	GLU	$y=0.8429x+1.1748$	0.9924	1.75–50	1.75 (175)
	GLN	$y=1.2928x+0.0307$	0.9969	0.025–50	0.025 (1)
	LAC	$y=0.4407x+0.0758$	0.9948	1–50	1 (4)
	GLUC	$y=0.6898x+0.6045$	0.9963	1–50	1 (20)
GFM	GLU	$y=0.8516x+0.1122$	0.9910	0.075–50	0.075 (7.5)
	GLN	$y=1.3024x+0.0103$	0.9965	0.05–50	0.05 (2)
	LAC	$y=0.4613x+2.6098$	0.9935	5–50	5 (20)
	GLUC	$y=0.4634x+0.3141$	0.9927	1–50	1 (20)

在准确度与回收率的考察中，以4种代谢产物在水及GFM培养基中进行连续6针和间隔18针的考察，准确度大部分均在 < 10%范

围内，回收率均在在85%~115%之间，详见表3。

表3. 准确度及回收率考察

Matrix	Item	Compounds	LLOQ		LQC		MQC		HQC	
			Accuracy (%)	Precision (%)						
H ₂ O	Within-run	GLU	93.96	16.19	96.14	7.61	110.29	7.03	86.75	7.05
		GLN	101.84	19.2	100.89	12.79	106.81	7.03	91.61	3.60
		LAC	107.11	11.03	101.61	12.29	103.46	6.23	103.28	5.96
	Between-run	GLUC	92.36	6.79	92.36	6.79	105.27	5.21	89.51	5.12
		GLU	95.76	4.5	98.56	5.43	101.40	3.27	86.34	3.04
		GLN	92.28	7.56	95.16	6.08	106.05	6.63	90.38	3.60
GFM	Within-run	LAC	110.46	9.58	94.06	5.17	95.26	2.34	105.89	7.16
		GLUC	93.68	9.51	93.05	9.59	108.66	0.83	102.63	6.22
		GLU	95.38	5.11	98.04	3.44	98.83	3.26	89.83	3.9
	Between-run	GLN	105.24	13.31	96.93	9.61	100.08	6.33	86.07	4.09
		LAC	116.17	18.29	101.14	2.52	99.87	3.4	109.15	3.79
		GLUC	91.36	7.98	95.20	4.89	99.34	8.48	93.95	7.41
Between-run	GLU	99.67	3.6	96.36	9.8	102.25	2.34	88.34	4.84	
	GLN	91.34	17.69	96.93	9.61	100.25	4.75	87.51	6.61	
	LAC	116.93	17.22	92.94	6.45	103.70	1.20	101.08	7.04	
	GLUC	92.24	8.58	98.21	11.38	97.18	6.89	100.56	9.53	

为了考察可能存在的残留影响，在定量上限(GLU为20 mM, GLN为10 mM, LAC为50 mM, GLUC为50 mM)连续注射6针标准样品后，立即注射空白样品水，连续3针，以评估GLU, GLN, LAC和GLUC在ADE-OPI-MS系统中的残留可能。空白样品中4种代谢物的峰面积应小于定量样品的20%，结果如3所示。

高通量筛选

本文中，我们重点筛选了来自SCg5的产谷氨酸菌株文库。这个文库是通过使用多种工程程序创建的，包括随机化学诱变、随机酶诱变和靶向基因修饰。共384份样品，包括从文库中随机抽取的348株试验菌株、12株含有主干质粒的对照菌株、6个校准液和18个质控样品(3个浓度水平见表S8)，组装成一个筛选板，进行

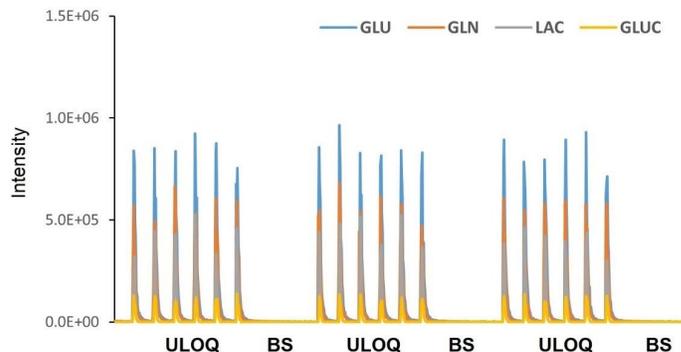


图3. GLU、GLN、LAC和GLUC的残留考察 (ULOQ: 定量上限, BS: 空白样品水)

处理和分析。在四种检测的代谢物中，谷氨酸被确定为筛选的主要指标。348株试验菌株中，52株(14.9%)谷氨酸浓度高于对照。对于工业菌株，底物-产物转化率也是一个关键指标。本文中葡萄糖-谷氨酸转化率(CR)被定义为谷氨酸产生与葡萄糖消耗的比率。乳酸和谷氨酰胺是主要的生物副产物。因此，为了最大限度地提高谷氨酸浓度和CR值，同时最大限度地减少乳酸和谷氨酰胺的产生，我们筛选出9株菌株(图4)，将阳性率从仅使用谷氨酸的14.9%(52/348)降低到2.6%(9/348)。使用多指标筛选可以显著降低阳性率，减少使用大型生物反应器进一步验证所需的工作量和时间。

总结

本研究建立了一种高通量自动化进行菌株筛选的平台——超高通量前处理及分析平台(UTPA)，包含了两个模块，分别为模块A自动化样品前处理系统及模块B声波激发串联三重四级杆系统，可实现在40 min内完成384孔样品的处理与检测，大幅提升了菌株筛选的时间。相较于LC-MS的方法，可提升72倍速度，并不再需要色谱柱、进样针等部件，减少成本的同时也不会存在残留问题。UTPA平台可广泛应用于需要快速收集大量生物数据的各种场合，拥有良好的应用前景。

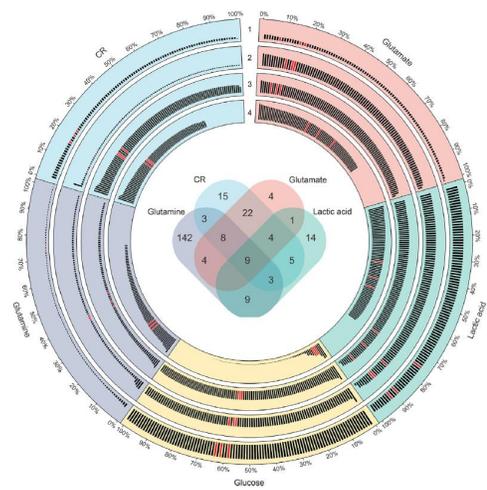


图4. 谷氨酸高产菌株的超高通量预处理分析(UTPA)平台筛选分析348个试验样品(黑色柱)和12个对照菌株(红色柱)。轨迹1-4代表96孔板1-4，在每条轨迹中，按照分析物含量的高低排列检测样品，采用百分比法快速观察阳性率。中央的维恩图显示了使用不同标准筛选的阳性菌株的交集。CR:葡萄糖-谷氨酸转化率。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32986-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7201
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)